WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/11211 **A2** Nicht klassifiziert (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. November 1989 (30,11.89) PCT/EP89/00579 (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (euro-(21) Internationales Aktenzeichen: päisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), IV, LU ( 24. Mai 1989 (24.05.89) (22) Internationales Anmeldedatum: päisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäi-(30) Prioritätsdaten: sches Patent), US. DE 24. Mai 1988 (24.05.88) P 38 17 591.6 Veröffentlicht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELL-SCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FOR-SCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLÖCKER, Helmut [DE/ DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

(74) Anwalt: BOETERS, Hans, D.; Thomas-Wimmer-Ring 14, D-8000 München (DE).

Mit einer Erklärung gemäss Artikel 17 Absatz 2(a). Ohne Klassifikation und ohne Zusammenfassung; Bezeichnung von der Internationalen Recherchenbehörde nicht überprüft.

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE BANK AND PROCESS FOR DNA SEQUENCING

(54) Bezeichnung: OLIGONUCLEOTIDBANK UND VERFAHREN ZUR DNA-SEQUENZIERUNG

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

ΑT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
ΑU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Fasso	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BG	Bulgarien	П	Italien	SD	Sudan .
BJ	Benin	JP	Japan	SE	Schweden
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	u	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Tago
CM	Kamerun	w	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		-
DK	Danemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

1

Oligonucleotidbank und Verfahren zur DNA-Sequenzierung

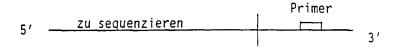
Die Sequenzanalyse von Nucleinsäurefragmenten, insbesondere von DNA, ist als ein Schlüsselverfahren der modernen Biowissenschaften und der modernen Biotechnologie anzusehen. In letzter Zeit gerät mit der ständigen Verfeinerung der Sequenzierungstechniken auch die Analyse von ganzen, komplexen Genomen in den Bereich des Möglichen.

Neben einigen weniger populären Methoden werden heutzutage vor allem zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Sequenzanalyse angewandt, und zwar

- die Sequenzierung durch chemische Modifizierung und Abbau (Maxam/Gilbert-Methode) sowie
- die Sequenzierung durch kontrollierten Polymerase-Einbau unterschiedlicher Nucleotide (Sanger-Methode); vgl. beispiels-weise Gassen & Schäfer, Sequenzbestimmung von Nucleinsäuren und Proteinen, in: Gassen et al, Gentechnik, 2. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, 1987, Seite 241 ff.

Die Sanger-Methode kann sowohl mit einzelsträngiger DNA, die speziell für den Zweck der Sequenzierung hergestellt wird, als auch seit wenigen Jahren mit jeder ausreichend reinen doppelsträngigen DNA durchgeführt werden. Ein durchgehendes Wesensmerkmal der Sanger-Methode bleibt jedoch unter anderem die Abhängigkeit der verwendeten Einbauenzyme (DNA-Polymerasen) sowohl von einer Matrize (Templat = zu sequenzierende DNA) als auch von einem Startmolekül (Primer). Der Primer ist in der Regel ein kurzes, chemisch synthetisiertes Oligonucleotid, das in seiner

ganzen Länge zu einem 3' von dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt gelegenen Teilstück basenkomplementär ist:



Die Anheftungsstelle (Hybridisierungsstelle) des Primers muß derart gewählt sein, daß unter den experimentellen Bedingungen der Primer nur die gewünschte und keine einzige weitere Anheftungsstelle findet, um ein lesbares Sequenzierungsergebnis erreichen zu können. Die Spezifität des Primers hängt direkt von seiner Länge und der Komplexität der im Experiment verwendeten DNA ab. Aus statistischen Erwägungen und praktischer Erfahrung ergibt sich, daß Primer mit einer Kettenlänge von bis zu 24 Basen für alle denkbaren Fälle ausreichen sollten.

Bei der Sequenzanalyse sehr langer DNA (beispielsweise bei Genomsequenzierungen) werden gegenwärtig im wesentlichen zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Strategie 1: Die Ein-Primer-Methode. Hierbei wird die zu sequenzierende DNA (je nach Verfahrensvariante) mehr oder weniger in Zufallsfragmente oder teilweise geordnete Fragmente zerlegt, wonach die Fragmente in ein und denselben Vektor inseriert werden. Nach Transformation von Zellen werden DNA-Präparationen von einzelnen Klonen hergestellt und der Sequenzanalyse unterworfen. Da sich alle DNA-Präparationen maximal um die inserierte DNA unterscheiden, kann für alle anstehenden Sequenzanalysen im Prinzip ein einziger Primer verwendet werden, der beispielsweise direkt neben der Insertionsstelle auf der Vektor-DNA hybridisiert. Diesem Vorteil stehen jedoch auch erhebliche Nachteile gegenüber,

î

ī

- denn da die Klone zufällig ausgesucht werden müssen, werden einzelne Abschnitte der Original-DNA sehr oft weit häufiger als nötig sequenziert, und
- schließlich klaffen in der mit Hilfe von geeigneten Computer-Programmen zu einer Gesamtsequenz geordneten Sammlung der Teilsequenzierungsergebnisse häufig beträchtliche Lücken, da beispielsweise gewisse Abschnitte der zu analysierenden Original-DNA "schwer klonierbar" sind.

Strategie 2: Die Mehr-Primer-Methode. Die zu sequenzierende DNA wird hier nicht wie bei Strategie 1 nach der Schrotschuß-Methode, sondern gezielt progressierend analysiert. Der in einem Experiment noch sicher zu entschlüsselnde Sequenzabschnitt dient zur Auswahl einer Primer-Anheftungsstelle für das nächste Experiment und so fort. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, daß unnötige Mehrfachsequenzanalysen wie bei der Strategie 1 vermieden werden. Der wohl wesentliche Grund, warum diese Methode nicht allein für die Analyse langer DNA-Abschnitte verwendet wird, liegt in der Beschränkung durch die gegenwärtig verfügbaren Methoden zur chemischen DNA-Synthese.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die jeweiligen Nachteile der oben beschriebenen Verfahren zu mildern, beispielsweise durch das "Multiplex-Sequencing" bei Strategie 1 und das simultane progressierende Sequenzieren von verschiedenen Stellen aus bei Strategie 2. Ein Weg, den wesentlichen Nachteil der Strategie 2 ganz zu beseitigen, liegt theoretisch darin, eine Bank aller denkbaren Primer anzulegen. Dies ist jedoch durch direkte chemische Synthese praktisch nicht möglich, da es allein 424 verschiedene Primer der Kettenlänge 24 gibt.

Erfindungsgemäß wird daher vorgeschlagen, kürzere, chemisch synthetisierte Oligonucleotide zu verwenden. Da jede längere Sequenz im Prinzip aus zwei oder mehr kürzeren Sequenzen zusammensetzbar ist, werden die dem gewünschten Primer entsprechenden

kurzen Oligonucleotide anstelle des gewünschten Primers zu der zu sequenzierenden DNA gegeben und durch eine

geeignete Prozedur, beispielsweise mit T4-DNA-Ligase, zu dem gewünschten Primer zusammengefügt. Die Sequenzierungsreaktion kann dann anschließend praktisch unter Standardbedingungen durchgeführt werden.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird durch die Gegenstände der Ansprüche gelöst.

#### Beispiel 1

In typischen Experimenten wurden ca. 2,5 pMol DNA des Plasmids pTZ18R (Pharmacia-LKB) mit NaOH denaturiert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde mit je 2,5 pMol zweier verschiedener Oligonucleotidlösungen versetzt. Die Oligonucleotide der Kettenlänge 8 (Octamere) waren derart gewählt, daß sie unmittelbar benachbart auf einem Abschnitt bekannter Nucleotidsequenz der Plasmid-PNA hybridisieren konnten. Das 5'-Ende des im hybridisierten Zustand benachbart zum 3'-Ende des anderen Oligonucleotids gelegenen Octamers war zuvor nach gängigen Verfahren mit T4-Polynucleotid-Kinase und ATP phosphoryliert worden. Nach Einstellen der bekannten Pufferbedingungen für Ligationen mit T4-DNA-Ligase und Versetzen mit 1 Einheit des Enzyms wurde die Lösung (10 µl Endvolumen) 4 h lang bei 15 °C inkubiert. Diese Ligationslösung wurde vor der Sequenzierung 5 min lang bei 37 °C aufbewahrt, um möglichst viele durch Ligation entstandene 16-mere und möglichst wenige 8-mere hybridisieren zu lassen.

Die folgende Sequenzierung sollte dazu dienen, die Sequenz des gewählten Vektors zu überprüfen. Für die Sequenzierungsreaktion nach dem Standardprotokoll der Firma United States Biochemical Corporation (USB) wurden 8 µl der Ligationslösung eingesetzt. Abweichend von diesem Protokoll wurde auf das "Annealing" von Templat und Primer verzichtet.

ттомискомителя и информация по по

?

Sofern die genannte Phosphorylierung in Gegenwart von [gamma- $^{32}$ P]ATP durchgeführt worden war, wurde auf die spätere Verwendung von [ $a-^{32}$ P]dATP verzichtet.

-6-

#### Patentansprüche

- 1. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 46 verschiedenen hexameren Oligonucleotide.
- 2. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^7$  verschiedenen heptameren Oligonucleotide.
- 3. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 48 verschiedenen octameren Oligonucleotide.
- 4. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 49 verschiedenen Oligonucleotide.
- 5. Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode, dadurch *gekennzeichnet*, daß man
- (a) bei der zu sequenzierenden DNA eine einzelsträngige Primeranheftungsstelle bekannter Sequenz wählt,
- (b) auf dieser Primeranheftungsstelle unmittelbar benachbart zwei hexamere, heptamere oder octamere Oligonucleotide (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) hybridisiert und
- (c) ggf. gleichzeitig mit Stufe (b) oder nach Stufe (b) ein weiteres hexameres, heptameres oder octameres Oligonucleotid (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) unmittelbar benachbart zu

einem der beiden anderen Oligonucleotide auf der Primeranheftungsstelle hybridisiert und

- (d) die Oligonucleotide zu einem Primer ligiert.
- 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man auf der Primeranheftungsstelle zwei Oligonucleotide hybridisiert und miteinander zu einem Prä-Primer ligiert und erst danach auf der Primeranheftungsstelle ein drittes Oligomeres hybridisiert und mit dem Prä-Primer ligiert.
- 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß man für die Primerbildung hexamere, heptamere und/oder octamere Oligonucleotide verwendet.
- 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Oligonucleotide verwendet, die an ihrem 5'-Ende, sofern dieses Ende mit einem benachbarten Oligonucleotid mit Hilfe von T4-DNA-Ligase ligiert werden soll, phosphoryliert sind.
- 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Ligation und vor der Sequenzierung nicht zum gewünschten Primer ligierte Oligonucleotide durch Wärmebehandlung entfernt.

#### PATENT COOPERATION TREATY

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT issued pursuant to PCT Article 17(2)(a)(1)

IDENTIFICATION OF THE INTERNATION APPLICATION	ONAL APPLICANT'S C 5352-GBF	APPLICANT'S OR AGENT'S FILE REFERENCE 5352-GBF	
International Application No. PCT/EP 89/00579	International 24 May 19	. Filing Date 189	
Receiving Office RO/EP	Priority Date 24 May 19		
Applicant (Name GESELLSCHAFT BIOTECHNOLOGISCHE FORSC mbH (GBF) et al.	• • • • • •	C 12 N 15/00 C 12 Q 1/68	
	DECLARATION		
This International Searching a search report will be establication for the reasons indicate	shed on the above-identifie	hat no international d international appli-	
1. The subject ma	tter of the international a	pplication relates to:(2)	
a. scientific the	ories ·		
b. mathematical th	heories.		
c. plant varieties	s·		
d. animal varietie	es·		
e. essentially bid animals, other of such process	ological processes for the than microbiological proceses.	production of plants and sses and the products	
f. schemes, rules	or methods of doing busine	SS.	
g. schemes, rules	or methods of performing p	urely mental acts.	
h. schemes, rules	or methods of playing game	s.	
1. methods for tre	eatment of the human body b	y surgery or therapy.	
j. methods for tre	eatment of the animal body	by surgery or therapy.	
k. diagnostic meth	hods.		
1. mere presentati	ions of information.		
	ams for which this Internat d to search prior art.	ional Searching Authority	
2. X The failure of comply with prebeing carried of	escribed requirements preve	international application to nts a meaningful search from	
a. the description	n.		
b. X the claims.			
c. the drawings.			
comment: Art. 17	7.2(a)(ii) The pater	at claims are not	
fully s	supported by the des	scription.	
	CERTIFICATION	Authorized Officer	
Authority	ate of Mailing	Authorized Officer	
	2 September 1989 12.09.89)		

Form PCT/ISA/203 (January 1985)

# VER . LA BER DIE INTERNATIONALE ZUS MENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

ERKLÄRUNG ÜBER DIE NICHTERSTELLUNG EINES INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a PCT<sup>1</sup>

KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMEI	AKTENZEICHEN DES ANMELDERS ODER ANWALTS LDUNG 5352-GBF		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum		
PCT/EP 89/00579	24. Mai 1989		
Anmeldeamt Beanspruchtes Prioritätsdatum			
RO/EP	24. Mai 1988		
Anmelder (Name) GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG mb	klassifikation der anmeldung OH (GBF) (int. Cl <sup>4</sup> ) C 12 N 15/00 C 12 Q 1/68		
	ERKLÄRUNG		
Die Internationale Recherchenbehörde erklärt hiermit, daß f Gründen kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird	für die oben genannte internationale Anmeldung aus den nachstehenden d. <sup>1</sup>		
Der Gegenstand der internationalen Anmeldung betrifft f	folgende Gebiete : <sup>2</sup>		
a. wissenschaftliche Theorien.			
b mathematische Theorien.			
c. Pflanzensorten.			
d. Tieranen.			
e. im wesentlichen biologische Verfahren zur Züchtur und der mit Hilfe dieser Verfahren gewonnenen Er	ng von Pflanzen und Tieren mit Ausnahme mikrobiologischer Verfahren rzeugnisse.		
f. Pläne, Regeln und Verfahren für eine geschäftliche	Tâtigkeit.		
g. Plāne, Regeln und Verfahren für rein gedankliche T	Tätigkeiten.		
h. Plāne, Regeln und Verfahren für Spiele.			
i. Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen E	Behandlung des menschlichen Körpers.		
. Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen E			
k. Diagnostizierverfahren.			
bloße Wiedergabe von Informationen.			
	die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Durchführung einer ist.		
2. X Die folgenden Teile der internationalen Anmeldung sinnvolle Recherche nicht durchgeführt werden kan	g entsprechen den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig, daß eine nn : <sup>3</sup>		
a. die Beschreibung.			
b. X die Ansprüche.			
c. die Zeichnungen.			
Bemerkungen: Art. 17.2 (a)(ii) Die Patentansprüche werden nicht			
in vollen Umfang durch die Beschreibung gestützt.			
DE	SCHEINIGUNG		
	Absendedatum Bevollmachtigter Bediensteter		
EUROPÄISCHES PATENTAMT	1000		
Neighteile III Dell Haag			
P.B. 5818 Patentiaan, 2 2280 HV RIJSWIJK (ZH) / Niederlande			
Telex 31651 \$ (070) 40-2040 @BREVPATENT	T.K. WILLIS		

#### **PCT**

(21) Internationales Aktenzeichen:

### WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 4:

C12Q 1/68, C12N 15/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/11211

(43) Internationales

DE

PCT/EP89/00579

Veröffentlichungsdatum:

(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Mai 1989 (24.05.89)

(30) Prioritätsdaten: P 38 17 591.6 24. Mai 1988 (24.05.88)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELL-SCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FOR-SCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLÖCKER, Helmut [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

(74) Anwalt: BOETERS, Hans, D.; Thomas-Wimmer-Ring 14, D-8000 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), IV (europäische

30. November 1989 (30.11.89)

päisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen
Frist Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 8. März 1990 (08.03.90)

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE BANK AND PROCESS FOR DNA SEQUENCING

(54) Bezeichnung: OLIGONUCLEOTIDBANK UND VERFAHREN ZUR DNA-SEQUENZIERUNG

(57) Abstract

Oligonucleotide bank and process for DNA sequencing according to the multi-primer method.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Oligonucleotidbank und ein Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

ΑT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
ΑU	Australien	គា	Final and	MR	Mauritanien
88	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	π	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF.	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	Ц	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DΕ	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		-
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Oligonucleotidbank und Verfahren zur DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von Nucleinsäurefragmenten, insbesondere von DNA, ist als ein Schlüsselverfahren der modernen Biowissenschaften und der modernen Biotechnologie anzusehen. In letzter Zeit gerät mit der ständigen Verfeinerung der Sequenzierungstechniken auch die Analyse von ganzen, komplexen Genomen in den Bereich des Möglichen.

Neben einigen weniger populären Methoden werden heutzutage vor allem zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Sequenzanalyse angewandt, und zwar

- die Sequenzierung durch chemische Modifizierung und Abbau (Maxam/Gilbert-Methode) sowie
- die Sequenzierung durch kontrollierten Polymerase-Einbau unterschiedlicher Nucleotide (Sanger-Methode); vgl. beispiels-weise Gassen & Schäfer, Sequenzbestimmung von Nucleinsäuren und Proteinen, in: Gassen et al, Gentechnik, 2. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, 1987, Seite 241 ff.

Die Sanger-Methode kann sowohl mit einzelsträngiger DNA, die speziell für den Zweck der Sequenzierung hergestellt wird, als auch seit wenigen Jahren mit jeder ausreichend reinen doppelsträngigen DNA durchgeführt werden. Ein durchgehendes Wesensmerkmal der Sanger-Methode bleibt jedoch unter anderem die Abhängigkeit der verwendeten Einbauenzyme (DNA-Polymerasen) sowohl von einer Matrize (Templat = zu sequenzierende DNA) als auch von einem Startmolekül (Primer). Der Primer ist in der Regel ein kurzes, chemisch synthetisiertes Oligonucleotid, das in seiner

Miseu

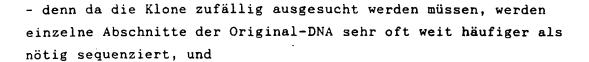
ganzen Länge zu einem 3' von dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt gelegenen Teilstück basenkomplementär ist:

		. Primer	
5/	zu sequenzieren		
J			3 ′

Die Anheftungsstelle (Hybridisierungsstelle) des Primers muß derart gewählt sein, daß unter den experimentellen Bedingungen der Primer nur die gewünschte und keine einzige weitere Anheftungsstelle findet, um ein lesbares Sequenzierungsergebnis erreichen zu können. Die Spezifität des Primers hängt direkt von seiner Länge und der Komplexität der im Experiment verwendeten DNA ab. Aus statistischen Erwägungen und praktischer Erfahrung ergibt sich, daß Primer mit einer Kettenlänge von bis zu 24 Basen für alle denkbaren Fälle ausreichen sollten.

Bei der Sequenzanalyse sehr langer DNA (beispielsweise bei Genomsequenzierungen) werden gegenwärtig im wesentlichen zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Strategie 1: Die Ein-Primer-Methode. Hierbei wird die zu sequenzierende DNA (je nach Verfahrensvariante) mehr oder weniger in Zufallsfragmente oder teilweise geordnete Fragmente zerlegt, wonach die Fragmente in ein und denselben Vektor inseriert werden. Nach Transformation von Zellen werden DNA-Präparationen von einzelnen Klonen hergestellt und der Sequenzanalyse unterworfen. Da sich alle DNA-Präparationen maximal um die inserierte DNA unterscheiden, kann für alle anstehenden Sequenzanalysen im Prinzip ein einziger Primer verwendet werden, der beispielsweise direkt neben der Insertionsstelle auf der Vektor-DNA hybridisiert. Diesem Vorteil stehen jedoch auch erhebliche Nachteile gegenüber,



- schließlich klaffen in der mit Hilfe von geeigneten Computer-Programmen zu einer Gesamtsequenz geordneten Sammlung der Teilsequenzierungsergebnisse häufig beträchtliche Lücken, da beispielsweise gewisse Abschnitte der zu analysierenden Original-DNA "schwer klonierbar" sind.

Strategie 2: Die Mehr-Primer-Methode. Die zu sequenzierende DNA wird hier nicht wie bei Strategie 1 nach der Schrotschuß-Methode, sondern gezielt progressierend analysiert. Der in einem Experiment noch sicher zu entschlüsselnde Sequenzabschnitt dient zur Auswahl einer Primer-Anheftungsstelle für das nächste Experiment und so fort. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, daß unnötige Mehrfachsequenzanalysen wie bei der Strategie 1 vermieden werden. Der wohl wesentliche Grund, warum diese Methode nicht allein für die Analyse langer DNA-Abschnitte verwendet wird, liegt in der Beschränkung durch die gegenwärtig verfügbaren Methoden zur chemischen DNA-Synthese.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die jeweiligen Nachteile der oben beschriebenen Verfahren zu mildern, beispielsweise durch das "Multiplex-Sequencing" bei Strategie 1 und das simultane progressierende Sequenzieren von verschiedenen Stellen aus bei Strategie 2. Ein Weg, den wesentlichen Nachteil der Strategie 2 ganz zu beseitigen, liegt theoretisch darin, eine Bank aller denkbaren Primer anzulegen. Dies ist jedoch durch direkte chemische Synthese praktisch nicht möglich, da es allein 424 verschiedene Primer der Kettenlänge 24 gibt.

Erfindungsgemäß wird daher vorgeschlagen, kürzere, chemisch synthetisierte Oligonucleotide zu verwenden. Da jede längere Sequenz im Prinzip aus zwei oder mehr kürzeren Sequenzen zusammensetzbar ist, werden die dem gewünschten Primer entsprechenden

kurzen Oligonucleotide anstelle des gewünschten Primers zu der zu sequenzierenden DNA gegeben und durch eine

geeignete Prozedur, beispielsweise mit T4-DNA-Ligase, zu dem gewünschten Primer zusammengefügt. Die Sequenzierungsreaktion kann dann anschließend praktisch unter Standardbedingungen durchgeführt werden.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird durch die Gegenstände der Ansprüche gelöst.

#### Beispiel 1

In typischen Experimenten wurden ca. 2,5 pMol DNA des Plasmids pTZ18R (Pharmacia-LKB) mit NaOH denaturiert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde mit je 2,5 pMol zweier verschiedener Oligonucleotidlösungen versetzt. Die Oligonucleotide der Kettenlänge 8 (Octamere) waren derart gewählt, daß sie unmittelbar benachbart auf einem Abschnitt bekannter Nucleotidsequenz der Plasmid-DNA hybridisieren konnten. Das 5'-Ende des im hybridisierten Zustand benachbart zum 3'-Ende des anderen Oligonucleotids gelegenen Octamers war zuvor nach gängigen Verfahren mit T4-Polynucleotid-Kinase und ATP phosphoryliert worden. Nach Einstellen der bekannten Pufferbedingungen für Ligationen mit T4-DNA-Ligase und Versetzen mit 1 Einheit des Enzyms wurde die Lösung (10 µl Endvolumen) 4 h lang bei 15 °C inkubiert. Diese Ligationslösung wurde vor der Sequenzierung 5 min lang bei 37 °C aufbewahrt, um möglichst viele durch Ligation entstandene 16-mere und möglichst wenige 8-mere hybridisieren zu lassen.

Die folgende Sequenzierung sollte dazu dienen, die Sequenz des gewählten Vektors zu überprüfen. Für die Sequenzierungsreaktion nach dem Standardprotokoll der Firma United States Biochemical Corporation (USB) wurden 8 µl der Ligationslösung eingesetzt. Abweichend von diesem Protokoll wurde auf das "Annealing" von Templat und Primer verzichtet.

Sofern die genannte Phosphorylierung in Gegenwart von [gamma- $^{3\,2}$ P]ATP durchgeführt worden war, wurde auf die spätere Verwendung von [ $\alpha-^{3\,2}$ P]dATP verzichtet.

#### Patentansprüche

- 1. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 46 verschiedenen hexameren Oligonucleotide.
- 2. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 47 verschiedenen heptameren Oligonucleotide.
- 3. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^8$  verschiedenen octameren Oligonucleotide.
- 4. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren 49 verschiedenen Oligonucleotide.
- 5. Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode, dadurch *gekennzeichnet*, daß man
- (a) bei der zu sequenzierenden DNA eine einzelsträngige Primeranheftungsstelle bekannter Sequenz wählt,
- (b) auf dieser Primeranheftungsstelle unmittelbar benachbart zwei hexamere, heptamere oder octamere Oligonucleotide (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) hybridisiert und
- (c) ggf. gleichzeitig mit Stufe (b) oder nach Stufe (b) ein weiteres hexameres, heptameres oder octameres Oligonucleotid (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) unmittelbar benachbart zu

einem der beiden anderen Oligonucleotide auf der Primeranheftungsstelle hybridisiert und

- (d) die Oligonucleotide zu einem Primer ligiert.
- 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß man auf der Primeranheftungsstelle zwei Oligonucleotide hybridisiert und miteinander zu einem Prä-Primer ligiert und erst danach auf der Primeranheftungsstelle ein drittes Oligomeres hybridisiert und mit dem Prä-Primer ligiert.
- 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch *gekennzeichnet*, daß man für die Primerbildung hexamere, heptamere und/oder octamere Oligonucleotide verwendet.
- 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Oligonucleotide verwendet, die an ihrem 5'-Ende, sofern dieses Ende mit einem benachbarten Oligonucleotid mit Hilfe von T4-DNA-Ligase ligiert werden soll, phosphoryliert sind.
- 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Ligation und vor der Sequenzierung nicht zum gewünschten Primer ligierte Oligonucleotide durch Wärmebehandlung entfernt.

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 89/00579

	IFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classif		
According	to International Patent Classification (IPC) or to both Nati	onal Classification and IPC	
Int.Cl	<sup>4</sup> : C120_1/68; C12N_15/00		·
II. FIELDS	S SEARCHED		
Classification	Minimum Documen	Itation Searched 7 Classification Symbols	
Classification	on System	Classification Symbols	
Int.Cl	<sup>4</sup> C12Q; C12N		
	Documentation Searched other t	han Minimum Documentation are included in the Fields Searched	
	to the Extent that such Documents	are included in the rields Searched	
	IMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		101
Category *	Citation of Document, 11 with indication, where app	ropriate, of the relevant passages 12	Relevant to Claim No. 13
γ	"Pharmacia Molecular Biologic May 1986, Rahm, (Lund, SE) see pages 95 - 107	cal Catalogue"	1-4
Y	DE, A, 3312929 (GESELLSCHAFT FORSCHUNG) 08 December 1983 see page 7, lines 11 - 30	FUR BIOTECHNOLOGISCHE	1-4
А	DNA vol. 3, No. 4, 1984, M. A. Li York, US) pages 339 - 343; R. Sanchez-P "Laboratory methods. Use of u deoxynucleotide primers for r chain termination sequencing"	Pescador et al.: Inpurified synthetic Papid dideoxynucleotide	
	-		
"A" doc cor "E" ear filir "L" doc wh cor "O" doc oth "P" doc iate	al categories of cited documents: 10 cument defining the general state of the art which is not usidered to be of particular relevance dier document but published on or after the international grates cument which may throw doubts on priority claim(s) or cich is cited to establish the publication date of another stion or other special reason (as specified) cument referring to an oral disclosure, use, exhibition or cer means cument published prior to the international filling date but or than the priority date claimed	"T" later document published after the or priority date and not in conflicted to understand the principle invention "X" document of particular relevance cannot be considered novel or involve an inventive step "Y" document of particular relevance cannot be considered to involve document is combined with one ments, such combination being of in the art.  "&" document member of the same p	e: the claimed invention cannot be considered to cannot be considered to the claimed invention an inventive step when the or more other such docubivious to a person skilled attent family
Date of th	e Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Se-	arch Report
21 0	December 1989 (21.12.89)	08 February 1990 (08	3.02.90)
	nal Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Fur	conean Patent Office		



ernational Application No. PCT/EP89/579

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET
· ·
v. observations where certain claims were found biosexichables not fully searchab
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:
1. Claim numbers
2. Claim numbers 1
Neither the description nor the claims disclose the
invention in a sufficiently clear manner for it to be
carried out by a person skilled in the art
(PCT Article 5). A meaningful search could thereforenot be carried out (PCT Article 17.2 (a) (ii)).
3. Claim numbers, because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of
PCT Rule 6.4(a).
VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING 2
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:
I. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only
those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
}
No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to
the Invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
As all searchable claims could be searched without affort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.
lemark on Protest
The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 89/00579

SA 29005

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

06/02/90

Patent document cited in search report	Publication date	Paten mem	t family her(s)	Publication date
DE-A-3312929	08-12-83	EP-A,B JP-A-	0103677 59026064	28-03-84 10-02-84
e dctails ahout this annex : se				

PCT/EP 89/00579

TIONALER RECHERCHENBERI Internationales Aktenzeichen

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Kl. 4 C12Q1/68; C12N15/00  II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE  Recherchierter Mindestprüfstoff 7  Klassifikationssytem Klassifikationssymbole  Int.Kl. 4 C12Q; C12N  Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgehiete fallen 8  III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN 9	I. KLASSIFIKATION DES ANN	IELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren	Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)	
III. RECHERCHERTE SACHGEDIETE  Recherchierer Mindestprufstoff ?  Klassifikationssymbole  Int.K1. 4 C12Q; C12N  Recherchiere nich rum Mindestprufstoff geborende Veroffentlichungen, soweit diese unter die recherchieren Sachgebiste fallen *  Ant.* Recherchieren nich rum Mindestprufstoff geborende Veroffentlichungen, soweit diese unter die recherchieren Sachgebiste fallen *  Ant.* Kennzeichnung der Veroffentlichung 11, someit erforderlich unter Angabe der maßgebischen feile 12  Y "Pharmacia Molecular Biological Catalogue"  Mai 1986, Rahm, (Lund, SE) siehe Seiten 95 – 107  Y DE A, 3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 08 Dezember 1983 siehe Seite 7, Zeilen 11 – 30  A DNA vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) Seiten 339 – 343; R. Sanchez-Pescador et al.: "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide chain termination sequencing"  "Resondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen den internationalen Anneideratum veroffentlichten wirden ist  "T. Veroffentlichung, die den allegnenden Stand der Lechnik termination sequencing"  "Resondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen der van der nach den internationalen Anneideratum veroffentlichten wirden ist  "T. Veroffentlichung, die den anderen an der nach den internationalen Anneideratum veroffentlichten geber werden soll der de sus einem anderen betonderen Grund angegeben it (reie ausgeduhn)  "T. Veroffentlichung, die verben soll der den uns eine hoften und ein anderen betonderen Grund angegeben it (reie ausgeduhn)  "T. Veroffentlichung, die verben soll der de usus einem anderen betonderen Grund angegeben it (reie ausgeduhn)  "T. Veroffentlichung, die verben soll der de usus einem anderen betonderen Grund angegeben it (reie ausgeduhn)  "T. Veroffentlichung, die verben soll der de usus einem anderen betonderen Grund angegeben verben soll der de usus einem anderen betonderen Grund angegeben verben soll der de usus einem eine Benatzung, eine de der verben eine der aus einem eine Benatzung eine der Veroffentl				
Recherchierter Mindestrutistoff?  Klassifikationssymbole  Int.Kl. 4	Int.Kl. 4	C12Q1/68; C12N15/00		
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff geborende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachechierte falten   Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff geborende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachechierte falten   Art.* Kennzeichnung der Veröffentlichunge <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der mangeblichen feile   Y "Pharmacia Molecular Biological Catalogue!" 1–4  Mai 1986, Rahm, (Lund, SE) siehe Seiten 95 – 107  Y DE, A, 3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FÖRSCHUNG) 08 Dezember 1983 siehe Seite 7, Zeilen 11 – 30  ADNA vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) Seiten 339 – 343; R. Sanchez-Pescador et al.: "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing!"  "Recondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen   "Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen   "Seine Zusammenfassung"  "Recondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen   "Veröffentlichung, die den allegmeinen Stand der Technik definieri, aber niet als besondern bedeutzum anzeschen ist versichen stellen   "Veröffentlichung, die den allegmeinen Stand der Technik definieri, aber niet als besondern bedeutzum anzeschen ist versichen stellen   "Veröffentlichung, die den allegmeinen Stand der Technik definieri, aber niet als besondern bedeutzum den stellen und   "Veröffentlichung, die den allegmeinen Stand der Technik der der ihr zugrundeliegenden Fhonie angegeben ist   "Veröffentlichung, die von den internationalen Annehdedatung, die werden der stellen von den der der hier zugrundeliegenden Fhonie angegeben ist berühen betracht werden und veröffentlichten versichen sich der versichen sich versichen si	II. RECHERCHIERTE SACIIGE	RIETE		
Recherchierte nicht zum Nindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachechiere fallen   MIL EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN  Art.* Kennzeichnung der Veröffentlichung   "Pharmacia Molecular Biological Catalogue"  Mai 1986, Rahm, (Lund, SE)  siehe Seiten 95 – 107  DE, A, 3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE  FORSCHUNG) 08 Dezember 1983  siehe Seite 7, Zeilen 11 – 30  A DNA  vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New  York, US)  Seiten 339 – 343; R. Sanchez-Pescador et al.:  "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic  deoxynucleotide primers for rapid  dideoxynucleotide chain termination sequencing"  siehe Zusammenfassung   **Newfordichung, die den aligemeinen Stand der Technik  definien, aber nicht als benofers Heintus an anzechen ist   "F. siterse Dekumen, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Annelderatum veröffentlichtung heigt werden soll oder die aus einem  andere heooderen Grund angegehe ist, einen Prioritätsanspruch  preferentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung,  eine Berutzung, eine Austellung der andere Münshmen  ber Jehr  Veröffentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung,  eine Berutzung, eine Austellung der andere Münshmen  ber Jehr  Veröffentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung,  eine Berutzung, eine Austellung der abere Münshmen  ber Jehr  Veröffentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung,  eine Berutzung, eine Austellung der abere Münshmen  ber Jehr  Veröffentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung,  eine Berutzung, eine Austellung der abere Münshmen  ber Jehr  Veröffentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung,  eine Berutzung, eine Austellung der abere   Veröffentlichung, die vor dem internationalen Annelderatung  eine Berutzung, eine Austentung der besteren   verständing kann nicht als auf eindereitscher Täligkeit   versteren versteren veröffentlichtung   verständung kann nicht als auf eindereitscher Täligkeit   versteren versteren veröffentlichtung   verständung von beso		Recherchierter M	lindestprufstoff 7	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff geborende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen   Ant.* Kennzeichnung der Veröffentlichung   "Pharmacia Molecular Biological Catalogue"  Mai 1986, Rahm, (Lund, SE)  siehe Seiten 95 – 107  DE, A, 3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FÜRSCHING) 08 Dezember 1983  siehe Seite 7, Zeilen 11 – 30  DNA vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US)  Seiten 339 – 343; R. Sanchez-Pescador et al.:  "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing"  siehe Zusammenfassung  "Recondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen   "Recondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen   "Veröffentlichung, die den aligemeinen Stand der Technik definient, aber nicht als benöders helevtsam anzeschen ist   "An anneideratum venöffentlicht worden dies veröffentlichung die sich auf eine mundliche Offenbarung,  nien Benarizung, eine Austellung der ander die sus veröffentlichung wie sich aus die sich auf eine mundliche Offenbarung,  nien Benarizung, eine Austellung der ander Müsnahmen  her Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung,  nien Benarizung, eine Austellung der ander Müsnahmen  her Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung,  nien Benarizung, eine Austellung der ander Müsnahmen  her Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung,  nien Benarizung, eine Austellung der ander Müsnahmen  her Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung,  nien Benarizung, eine Austellung der ander Müsnahmen  her Veröffentlichung der der Weröffentlichung mit   1. Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung,  nien Benarizung, eine Austellung der andere Müsnahmen  her Veröffentlichung der Benarizung die benarpruchten  her Veröffentlichung der der Weröffentlichung mit   1. Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung,  nien Benarizung, eine Austellung der an	KJassifikationssytem		Uassifikationssymbole	
III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN  Art.  Art.  Kennzeichnung der Veröffentlichung   "Pharmacia Molecular Biological Catalogue"  Mai 1986, Rahm, (Lund, SE)  siehe Seiten 95 – 107  DE, A, 3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 08 Dezember 1983  siehe Seite 7, Zeilen 11 – 30  DNA  Vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US)  Seiten 339 – 343; R. Sanchez-Pescador et al.:  "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing"  siehe Zusammenfassung  "Resondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen   "To Veröffentlichung die eingen ist, einen Prioritätsdappruch   veröffentlichung die eingen ist, einen Prioritätsdappruch   veröffentlichung die eingen ist, einen Prioritätsdappruch   veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruch   "To Veröffentlichung die sich auf eine mindliche Offenbarung,   veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruch   veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruch   "To Veröffentlichung die veröffentlichung   "To Veröffentlichung   die beanspruch   "To Ve	Int.Kl. 4	C12Q ; C12N		-
Art.3 Kennzeichnung der Veröffentlichung 11 , snweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Feile 12  Y "Pharmacia Molecular Biological Catalogue" 1–4  Mai 1986, Rahm, (Lund, SE) siehe Seiten 95 – 107  Y DE, A, 3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 08 Dezember 1983 siehe Seite 7, Zeilen 11 – 30  A DNA vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) Seiten 339 – 343; R. Sanchez-Pescador et al.: "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing" siehe Zusammenfassung ——  **Resondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen 10 : "A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definier, aber nicht als besonders hedeustam anzuschen ist "F' alteree Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen veröffentlichung, die gedien ist, einen Prioritätsnappruch veröffentlichung, die gedien ist mech dem seiner mechen veröffentlichung, die gedien ist mechen der dem Veröffentlichung, die gedien ist mechen der dem Veröffentlichung, die sein auf eine mudiche Olfenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Malnahmen bezieht  **TV Veröffentlichung, die sein auf eine mudiche Olfenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Malnahmen bezieht  **TV Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, die vor hende der verbridung gebracht wird dieser Veröffentlichung dieser veröffentlic				
Y "Pharmacia Molecular Biological Catalogue" 1-4  Mai 1986, Rahm, (Lund, SE)     siehe Seiten 95 - 107  Y DE,A, 3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 08 Dezember 1983     siehe Seite 7, Zeilen 11 - 30  A DNA     vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US)     Seiten 339 - 343; R. Sanchez-Pescador et al.:     "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing" siehe Zusammenfassung  **Recondere Kategorien von angegebenen Verinffentlichungen 10:     "A' Veröffentlichung, die den allegmeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als beronders hedeutstan anzuschen ist Falteres Dokumen, das jedoch erst am der nach dem internationalen Anneldedatum werffentlich werden ist 11.**  **T' Spätere Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsparpruch veriffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsparpruch veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsparpruch veröffentlichung, die geginget ist, einen Benutzung, eine Ausstellung oder andere Malonahmen bezieht  "T' Veröffentlichung, die geginget ist, einen Prioritätsparpruch veröffentlichung von besonderer Bederung die bezugen betraffentlich von ist und mit der Anmelden geharben in Geren men veröffentlicht worden ist  "T' Veröffentlichung, die geginget ist, einen Prioritätsparpruch veröffentlichung von besonderer Beder Erifindung von besonderer Beder Erifindung von besonderer Beder Erifindung von besonderer Bederung dieser beginnen veröffentlichung dieser				
"Pharmacia Molecular Biological Catalogue"  Mai 1986, Rahm, (Lund, SE) siehe Seiten 95 - 107  Y DE,A,3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 08 Dezember 1983 siehe Seite 7, Zeilen 11 - 30  A DNA Vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) Seiten 339 - 343; R.Sanchez-Pescador et al.: "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing" siehe Zusammenfassung  "F ältere Dekument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmederaum veröffentlichung dei seiten dem internationalen Anmederaum veröffentlichung der siehe Reitstellen veröffentlichung der anderen besonderen Gründlichen gelegen werden soll oder die aus einem anderen Neröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen Neröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Abstellung oder andere Malbnahmen bezieht "P' Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Abstellung oder anderen Malbnahmen bezieht "P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmederdau mit benutzung veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspru te Effindung kann nicht als auf erinderischer Tätigkeit verhend betrachtet werden veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspru te Effindung kann nicht als auf erinderischer Tätigkeit verhend betrachtet werden veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspru te Effindung kann nicht als auf erinderischer Tätigkeit verhend betrachtet werden veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspru te Effindung kann nicht als auf erinderischer Tätigkeit verhend betrachtet werden, werden auf dere Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspru te Effindung kann nicht als auf erinderischer Tätigkeit verhend betrachtet werden, werden auf erinderischer Tätigkeit verhend betrachtet werden, werden auf erinderischer Tätigkeit verhend betrachtet werden, werden auf erinderischer Tätigkeit verhend betra	III. EINSCHLAGIGE VEROFFI	:ntliciiungen <sup>q</sup>		
Mai 1986, Rahm, (Lund, SE) siehe Seiten 95 - 107  DE,A,3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 08 Dezember 1983 siehe Seite 7, Zeilen 11 - 30  A DNA vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) Seiten 339 - 343; R.Sanchez-Pescador et al.: "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing" siehe Zusammenfassung  "Resondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen 10: "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders hedeutsam anzuschen ist "E" Hieres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem interna- tionalen Anmeldesatum veröffentlicht worden ist "I. Veröffentlichung, die egenjent ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröf- fentlichungsdatum einen anderen im Recherchenbericht ge- nannten Veröffentlichung die vor dem internationalen Anmeldesatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffent- licht werden ist  TV. RESCIENIGUNG  Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  21. DEZEMBER 1989  Mai 1986 Rehm (Lund, SE)  1-4  TO Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als hen oder auf erinderischer internationalen Anmeldesatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffent- licht werden ist  TV. RESCIENIGUNG  Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Art.º Kennzeichnung de	r Veröffentlichung $^{11}$ , soweit erforderlich unt	er Angabe der maßgeblichen Teile 12	Betr. Anspruch Nr. 13
FORSCHUNG) 08 Dezember 1983 siehe Seite 7, Zeilen 11 – 30  DNA vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) Seiten 339 – 343; R. Sanchez-Pescador et al.: "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing" siehe Zusammenfassung  "Resondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen 10 : "A' Veröffentlichung, die den allegmeinen Stand der Technik definiert, aber incht als bespinders hedeutsam anzuschen ist "Fr älteres Dokumen, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlichung die geelanet ist, einen Prioritätsanspruch veröffentlichung, die solch auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen berleht "P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlichung mit einer defer mertera last auf erifinderischer Tätigkeit ruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung die bensten berleht "P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlichung mit einer defer merteren als auf erifinderischer Tätigkeit ruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer defer merteren als auf erifinderischer Tätigkeit ruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer defer merteren als auf erifinderischer Tätigkeit ruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer defer merteren als auf erifinderischer Tätigkeit ruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder merteren als auf erifinderischer Tätigkeit ruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder merteren als auf erifinderischer Tätigkeit ruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer ode	Mai 198	B6, Rahm, (Lund, SE)	l Catalogue"	1-4
vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) Seiten 339 – 343; R.Sanchez-Pescador et al.:  "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing" siehe Zusammenfassung  "A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als beşinders hedeutsam anzuschen ist "F" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "Veröffentlichungsdatum weröffentlich worden ist "Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchehenichts genannten Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchehenichts genannten Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Benutzung, eine Renutzung, eine Renutzung, eine Renutzung, eine Renutzung, eine Renutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlichung wir besonderer Bedeutung; die beanspru et Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigke ib ernspru te Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Türken betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder meneren anderen weröffentlichung mit einer oder meneren anderen veröffentlichung mit einer oder meneren anderen Veröffentlichung die Veröffentlichung die Veröffentlichung die Veröffentlichung mit einer oder meneren anderen veröffentlichung mit einer oder meneren anderen Veröffentlichung die Veröffentlic	FORSCHL	ING) 08 Dezember 1983	BIOTECHNOLOGISCHE	1-4
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders hedeutsam anzuschen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "I." Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soli oder die aus einem anderen besonderen Grund angegehen ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mudliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlichung mit einer oder menreren anderen Veröffentlichung dieser k gorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung einen Fachmann naheliegend ist  1V. BESCHEINIGUNG  Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  21. DEZEMBER 1989  Absendedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlichung mit der Anmeldedatum oder der ihr zugrundeliegenden Theorie ander der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist  22. Veröffentlichung, die ver	vol. 3, York, U Seiten "Labora deoxynu dideoxy	US) 339 - 343; R.Sanchez-Pe tory methods. Use of un cleotide primers for ra nucleotide chain termina	scador et al.: purified synthetic pid	5
	"A" Veröffentlichung, die der definiert, aber nicht als is ätteres Dokument, das je tionalen Anmeidedatum "I." Veröffentlichung, die gee zweifelhaft erscheinen zu fentlichungsdatum einer nannten Veröffentlichung anderen besonderen Grut "O" Veröffentlichung, die sie eine Benutzung, eine Aubezieht "P" Veröffentlichung, die vortum, aber nach dem beat licht worden ist IV. RESCHEINIGUNG Datum des Abschlusses der intern	n allgemeinen Stand der Technik besonders hedeutsam anzuschen ist edoch erst am oder nach dem internaveroffentlicht worden ist eignet ist, einen Prioritätsanspruch lassen, oder durch die das Veröfanderen im Recherchenbericht gegoehele ist (wie ausgeführt) ih auf eine mündliche Offenbarung, sstellung oder andere Maßnahmen er dem internationalen Anmeldedanspruchten Prioritätsdatum veröffentationalen Recherche	meldedatum oder dem Prioritätsdatum veist und mit der Anmeldung nicht kollidie Verständnis des der Erfindung zugrundel oder der ihr zugrundeliegenden Theorie : "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutu te Erfindung kann nicht als neu oder auf keit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutu te Erfindung kann nicht als auf erfinderi ruhend betrachtet werden, wenn die Veröfentlich gorie in Verbindung gebracht wird und dienen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Absendedatum des internationalen Reches	profentlicht worden  rtt, sondern nur zum  iegenden Prinzips  angegeben ist  ing; die beanspruch-  ierinderischer Tätig-  ing; die beanspruch-  scher Tätigkeit be-  ffentlichung mit  chungen dieser Kate-  lese Verbindung für  Patentfamilie ist
Internationale Recherchenbehörde Unterschrift des bevollmachtigten Rediensteten	21.DEZE	MBER 1989	0 8 FEB 1990	IJ
	Internationale Recherchenbehörde	2	Unterschrift des bevollmächtigten Redien	steten
EUROPAISCHES PATENTAMT	EUROPA	AISCHES PATENTAMT		TK WILLES

WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2	
V. BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS unvollständig recherchie	erbar erwiesen hab
Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der in:	
Recherche gewesen:	
1. Ansprüche Nr, weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht	verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. 1-9, weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgesch so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich	nriebenen Anforderungen h
Der Erfindung ist nicht deutlich in der Beschreibung ode	ech
Patentansprüche zu offenbaren, dass ein Fachman Sie dans ausführen kann (Art. 5, PCT). Für diesen Grund war eine	sinnvolle
Recherche nicht möglich (Art. 17.2 (a)(ii) PCT).	
3. Ansprüche Nr , weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.	4 a) PCT aboefa@t sind
Anapitudie III	
VI. BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG <sup>2</sup>	
Die Internationale Recherchenbehorde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen en	thait:
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt s Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.	ich der internationale
2. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, ers	streckt sich der interna-
tionale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt wo	orden sind, nämlich
Control of the contro	-actionale Recherches
3. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der inte bericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ans	prüchen erfaßt:
4. Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konstalliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde eine solche Gebi	note, der eine zu-
satzliche Recherchengebuhr gerechttertigt hatte, hat die Internationale Recherchenbehorde eine solche Geol Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs	
Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.	

## ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

ì

EPO FORM P0473

EP 8900579

SA 29005

In diesem Anlang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

06/02/90

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-3312929	08-12-83	EP-A,B 010367 JP-A- 59026064	7 28-03-84 4 10-02-84